

09/868338

日本国特許庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

JP99/7079

REC'D 04 JAN 2000

WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1998年12月18日

出願番号
Application Number:

平成10年特許願第360621号

出願人
Applicant(s):

味の素株式会社

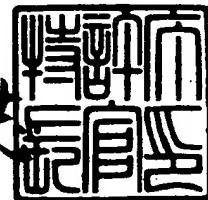
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年 6月11日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

佐山 建志



出証番号 出証特平11-3037823

【書類名】 特許願
【整理番号】 P-6003
【提出日】 平成10年12月18日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 C12N 15/00
【発明の名称】 A B C トランスポーター及びそれをコードする遺伝子
【請求項の数】 11
【発明者】
【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社発酵
技術研究所内
【氏名】 菅野 壮平
【発明者】
【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社発酵
技術研究所内
【氏名】 木村 英一郎
【発明者】
【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社発酵
技術研究所内
【氏名】 松井 和彦
【発明者】
【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社発酵
技術研究所内
【氏名】 中松 亘
【特許出願人】
【識別番号】 000000066
【氏名又は名称】 味の素株式会社
【代理人】
【識別番号】 100089244
【弁理士】

【氏名又は名称】 遠山 勉

【選任した代理人】

【識別番号】 100090516

【弁理士】

【氏名又は名称】 松倉 秀実

【選任した代理人】

【識別番号】 100100549

【弁理士】

【氏名又は名称】 川口 嘉之

【連絡先】 03-3669-6571

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 012092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 A B C トランスポーター及びそれをコードする遺伝子

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記（A）又は（B）に示すタンパク質。

（A）配列表の配列番号8に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

（B）配列表の配列番号8に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、A B C トランスポーターを構成するタンパク質。

【請求項2】 下記（A）又は（B）に示すタンパク質をコードするDNA

（A）配列表の配列番号8に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

（B）配列表の配列番号8に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、A B C トランスポーターを構成するタンパク質。

【請求項3】 下記（a）又は（b）に示すDNAである請求項2記載のDNA。

（a）配列表の配列番号7の塩基番号1～1101からなる塩基配列を含むDNA。

（b）配列表の配列番号7の塩基番号1～1101からなる塩基配列とストリングエントな条件下でハイブリダイズし、かつ、A B C トランスポーターを構成するタンパク質をコードするDNA。

【請求項4】 下記（C）又は（D）に示すタンパク質。

（C）配列表の配列番号9に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

（D）配列表の配列番号9に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、A B C トランスポーターのATPase活性を有するタンパク質。

【請求項5】 下記（C）又は（D）に示すタンパク質をコードするDNA

（C）配列表の配列番号9に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(D) 配列表の配列番号9に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、ABCトランスポーターのATPase活性を有するタンパク質。

【請求項6】 下記(c)又は(d)に示すDNAである請求項5記載のDNA。

(c) 配列表の配列番号7の塩基番号1117~1725からなる塩基配列を含むDNA。

(d) 配列表の配列番号7の塩基番号1117~1725からなる塩基配列とストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつ、ABCトランスポーターのATPase活性を有するタンパク質をコードするDNA。

【請求項7】 下記(E)又は(F)に示すタンパク質。

(E) 配列表の配列番号10に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(F) 配列表の配列番号10に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、ABCトランスポーターを構成するタンパク質。

【請求項8】 下記(E)又は(F)に示すタンパク質をコードするDNA

(E) 配列表の配列番号10に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(F) 配列表の配列番号10に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、ABCトランスポーターを構成するタンパク質。

【請求項9】 下記(e)又は(f)に示すDNAである請求項2記載のDNA。

(e) 配列表の配列番号7の塩基番号1759~2367からなる塩基配列を含むDNA。

(f) 配列表の配列番号7の塩基番号1759~2367からなる塩基配列とストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつ、ABCトランスポーターを構成するタンパク質をコードするDNA。

【請求項10】 配列番号8記載のアミノ酸配列を有するタンパク質をコ-

ドする塩基配列と、配列番号9記載のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする塩基配列と、配列番号10記載のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする塩基配列とを含むDNA。

【請求項11】 配列番号7記載の塩基配列を有する請求項10記載のDNA A。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、新規なABCトランスポーター及びその構成成分であるタンパク質をコードする遺伝子に関する。該遺伝子は、アミノ酸の細胞膜輸送が改変された微生物の育種等に利用することができる。

【0002】

【従来の技術】

アミノ酸やイオン等の物質が細胞膜を透過するための機構としていくつか知られているが、その一つとしてATP結合カセット(ATP binding cassette)スーパーファミリー(ABCトランスポーター)が知られている(C. F. Higgins, et al., Rev. Cell Biol., 8, 67 (1992))。

【0003】

ATP結合カセットは、膜貫通ドメインを含むATP結合ドメインを有する一群のタンパク質であり、その生理的機能は主として物質の細胞内への取り込みであるが、物質の排出にもある程度関与していると考えられている。細菌では多くの場合、膜タンパク質(膜成分)、膜の内側にありATPase活性を有するタンパク質、及び膜の外側にあり輸送される物質に結合する結合タンパク質を構成成分として含んでおり、膜タンパク質とATPase活性を有するタンパク質は多量体複合体を形成している。尚、物質の排出システムは、輸送される物質に結合する結合タンパク質を欠いているといわれている(Reizer, J. et al., Prot. Sci., 1, 1326 (1992))。

【0004】

ABCトランスポーター又はその構成成分は物質の輸送に関与しているため、

これらの遺伝子の発現を改変することによって、細胞の物質輸送に関する特性を改変させることができると考えられる。

【0005】

エシェリヒア・コリ等の細菌では種々のABCトランスポーター遺伝子の構造が解析され、ABCトランスポーターの構成成分をコードする各遺伝子は、オペロンを形成していることが知られている。しかし、コリネ型細菌ではアミノ酸の膜輸送に関するABCトランスポーターやその構成成分をコードする遺伝子は未知のものが多い。

【0006】

【発明の概要】

本発明者は、コリネ型L-グルタミン酸生産菌の育種を目的として、L-グルタミン酸合成経路のうちの一つに関与する酵素グルタミン-オキソグルタル酸アミノトランスフェラーゼ（グルタミン酸シンターゼとも呼ばれる。以下「GOGAT」と略す）をコードする遺伝子をクローニングした。その過程において、GOGATをコードする遺伝子(gltBD)を含むDNA断片が、アミノ酸の輸送に関わると考えられるABCトランスポーターをコードする遺伝子を含むことを偶然見出し、本発明を完成するに至った。

【0007】

すなわち本発明は、ABCトランスポーターの構成成分であるタンパク質、及びそれらをコードするDNAである。

【0008】

本発明のABCトランスポーターの第1の構成成分は、下記(A)又は(B)に示すタンパク質である。

(A)配列表の配列番号8に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B)配列表の配列番号8に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、ABCトランスポーターを構成するタンパク質。

【0009】

本発明のABCトランスポーターの第2の構成成分は、下記(C)又は(D)

に示すタンパク質である。

(C) 配列表の配列番号9に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(D) 配列表の配列番号9に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、ABCトランスポーターのATPase活性を有するタンパク質。

【0010】

本発明のABCトランスポーターの第3の構成成分は、下記(E)又は(F)に示すタンパク質である。

(E) 配列表の配列番号10に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(F) 配列表の配列番号10に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、ABCトランスポーターを構成するタンパク質。

【0011】

本発明はまた、上記ABCトランスポーターの各構成成分であるタンパク質をコードするDNAを提供する。

さらに本発明は、ABCトランスポーターをコードするオペロンを提供する。

【0012】

【0013】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明のDNAは、ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタムからgltB遺伝子の近傍に存在するORFとして見い出されたものであり、次のようにして取得することができる。

【0014】

ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム、例えばブレビバクテリウム・ラクトファーメンタムATCC13869の染色体DNAを鑄型とし、エシェリヒア・コリK-12(Gene、第60巻、1~11頁、1987年)及び酵母(サッカロマイセス・セレビシエ、GenBank accession No.X89221)のgltBD遺伝子間で相同性の高い領域の塩基配列、例えば配列表の配列番号1に示す塩基配列を有

するプライマー及び配列表の配列番号2に示す塩基配列を有するプライマーを用いたPCR(ポリメラーゼ・チェイン・リアクション)により、約1.4kbのDNA断片を取得する。プレビバクテリウム・ラクトファーメンタムATCC13869は、ATCC(アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(American Type Culture Collection)：アメリカ合衆国、メリーランド20852、ロックビル、パークロードライブ10301)から入手することができる。

【0015】

次に、上記のようにして得られるPCR増幅断片をプローブとし、プレビバクテリウム・ラクトファーメンタムATCC13869の染色体DNAライブラリーのコロニーハイブリダイゼーションを行い、前記プローブにハイブリダイズするDNA断片を取得することにより、g1tBD遺伝子とともに本発明のDNAを取得することができる。染色体DNAライブラリーの調製に、HindIIIで切断した染色体DNAを用いると、上記DNA断片は約14kbの大きさを持つ断片として得ることができる。

【0016】

上記のDNA断片にはg1tBD遺伝子が含まれ、その下流には、末端からg1tBD遺伝子と逆向きに2つのオープンリーディングフレーム(ORF)が存在する。これらのORFは、配列番号7に示す塩基配列に含まれるORFのうち、2番目及び3番目のORFにそれぞれ相当する。

【0017】

後記実施例に示すように、上記2つのORFは、これらの上流に存在する他の一つのORFとともに、オペロンを形成している可能性がある。このORFは、配列番号7に示す塩基配列に含まれるORFのうち1番目のORFに相当する。この1番目のORFは、プレビバクテリウム・ラクトファーメンタム、例えばプレビバクテリウム・ラクトファーメンタムATCC13869の染色体DNAを錠型とし、配列表の配列番号5に示す塩基配列を有するプライマー及び配列表の配列番号6に示す塩基配列を有するプライマーを用いたPCRにより、約1.8kbのDNA断片として取得することができる。このDNA断片には、目的とするORFの上流に、プロモーター領域と推定される領域が存在する。

【0018】

配列番号7に示した塩基配列は、上記の約14kbのDNA断片中の塩基配列(1.3kb)と、約1.8kbのDNA断片中の塩基配列(1.1kb)を連結したものである。

【0019】

上記の各ORFは、その塩基配列及び隣接する領域の塩基配列が明らかになつたので、それらの塩基配列に基づいて作製したオリゴヌクレオチドをプライマーに用いたPCRによっても、取得することができる。

【0020】

染色体DNAの調製、染色体DNAライブラリーの作製、ハイブリダイゼーション、PCR、プラスミドDNAの調製、DNAの切断及び連結、形質転換、プライマーとして用いるオリゴヌクレオチドの設定等の方法は、当業者によく知られている通常の方法を採用することができる。これらの方法は、Sambrook,J.,Fritsch,E.F.,Maniatis,T.,Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press,1.21(1989)等に記載されている。

【0021】

上記の第二のORF及びそれによってコードされるアミノ酸配列について、既知の配列と相同性比較を行った。用いたデータベースは、EMBLおよびSWISS-PROTである。その結果、これらの配列は、表1に示す既に報告されているアミノ酸の輸送を司るABCトランスポーターを構成するATPaseタンパク質及びそれをコードする遺伝子と相同性が認められた。これを含む3つのORFはオペロンを形成している可能性がある。

【0022】

【表1】

表1

遺伝子	輸送物質	由来	文献	相同性
artP	アラギニン	<i>E. coli</i>	J. Bacteriol. 175:3687-3688(1993)	31.0%
artP	アラギニン	<i>Haemophilus influenzae</i>	Science 269:496-512(1995)	31.8%
glnQ	グルタミン	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	J. Bacteriol. 173:4877-4888(1991)	35.4%
glnQ	グルタミン	<i>E. coli</i>	Mol. Gen. Genet. 205:260-269(1986)	33.5%
gltL	グルタミン酸/ アスパラギン酸	<i>E. coli</i>	GeneBank Accession No. U10981	33.5%
gltL	グルタミン酸/ アスパラギン酸	<i>Haemophilus influenzae</i>	Science 2629:496-512(1995)	31.2%
gluA	グルタミン酸	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	J. Bacteriol. 177:1152-1158	34.4%
hisP	ヒスチジン	<i>E. coli</i>	Nature 298:723-727(1982)	33.0%
hisP	ヒスチジン	<i>Salmonella typhimurium</i>	Nucleic acids Res. 15:8568-8568	34.4%

【0023】

本発明のABCトランスポーターの構成成分をコードする遺伝子は、コードされる各タンパク質の特性が損なわれない限り、1若しくは複数の位置での1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むATP結合タンパク質をコードするものであってもよい。ここで、「数個」とは、アミノ酸残基のタンパク質の立体構造における位置や種類によっても異なる。それは、イソロイシンとバリンのように、アミノ酸によっては、類縁性の高いアミノ酸が存在し、そのようなアミノ酸の違いが、蛋白質の立体構造に大きな影響を与えないことに由来する。

【0024】

上記のようなABCトランスポーターの構成成分と実質的に同一のタンパク質をコードするDNAは、例えば部位特異的変異法によって、特定の部位のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むように塩基配列を改変することによって得られる。また、上記のような改変されたDNAは、従来知られている変異処理によっても取得され得る。変異処理としては、各タンパク質をコードするDNAをヒドロキシルアミン等でインピトロ処理する方法、及び各々のタンパク質をコードするDNAを保持する微生物、例えばエシェリヒア属細菌を、紫外線照射またはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン(NTG)もしくは亜硝酸等の通常変異処理に用いられている変異剤によって処理する方法が挙げられる。

【0025】

また、上記のような塩基の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位等には、各構成成分を保持する微生物の個体差、種や属の違いに基づく場合などの天然に生じる変異(mutant又はvariant)も含まれる。

【0026】

上記のような変異を有するDNAを、適当な細胞で発現させ、発現産物の性質を調べることにより、ABCトランスポーターの構成成分と実質的に同一のタンパク質をコードするDNAが得られる。また、変異を有する各タンパク質をコードするDNAまたはこれを保持する細胞から、例えば、ATPaseにあっては、配列番号7の塩基番号1117～1725からなる塩基配列を有するDNAと、ストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつ、各構成成分の特性を有するタンパク質をコードするDNAを単離することによっても、ABCトランスポーターの構成成分と実質的に同一のタンパク質をコードするDNAが得られる。ここでいう「ストリンジエントな条件」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。この条件を明確に数値化することは困難であるが、一例を示せば、相同性が高いDNA同士、例えば80%以上の相同性を有するDNA同士がハイブリダイズし、それより相同性が低いDNA同士がハイブリダイズしない条件、あるいは通常のサザンハイ

ブリダイゼーションの洗いの条件である60℃、1×SSC、0.1%SDS、好ましくは、0.1×SSC、0.1%SDSに相当する塩濃度でハイブリダイズする条件が挙げられる。

【0027】

このような条件でハイブリダイズする遺伝子の中には途中にストップコドンが発生したものや、活性中心の変異により活性を失ったものも含まれるが、それらについては、市販の活性発現ベクターを用いて発現産物の特性を調べることにより、容易に取り除くことができる。

【0028】

本発明のABCトランスポーターの構成成分をコードするDNA及びABCトランスポーターのオペロン（以下、これらを単に「本発明の遺伝子」ということがある）は、コリネ型細菌の育種に利用することができる。すなわち、本発明のABCトランスポーター又はその構成成分は、アミノ酸の輸送に関与していると考えられるため、これらの遺伝子の発現を改変することによって、細胞のアミノ酸輸送に関する特性を改変させることができると考えられる。

【0029】

本発明を適用し得るコリネ型細菌は、従来プレビバクテリウム属に分類されていたが現在コリネバクテリウム属に統合された細菌を含み（Int. J. Syst. Bacteriol., 41, 255 (1981)）、またコリネバクテリウム属と非常に近縁なプレビバクテリウム属細菌を含む。このようなコリネ型細菌の例として以下のものが挙げられる。

【0030】

コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム

コリネバクテリウム・アセトグルタミカム

コリネバクテリウム・アルカノリティカム

コリネバクテリウム・カルナエ

コリネバクテリウム・グルタミカム

コリネバクテリウム・リリウム（コリネバクテリウム・グルタミカム）

コリネバクテリウム・メラセコーラ

コリネバクテリウム・サーモアミノゲネス
 コリネバクテリウム・ハーキュリス
 プレビバクテリウム・ディバリカタム (コリネバクテリウム・グルタミカム)
 プレビバクテリウム・フラバム (コリネバクテリウム・グルタミカム)
 プレビバクテリウム・インマリオフィラム
 プレビバクテリウム・ラクトファーメンタム (コリネバクテリウム・グルタミカム)
 プレビバクテリウム・ロゼウム
 プレビバクテリウム・サッカロリティカム
 プレビバクテリウム・チオゲニタリス
 プレビバクテリウム・アルバム
 プレビバクテリウム・セリヌム
 ミクロバクテリウム・アンモニアフィラム

【0031】

具体的には、下記のような菌株を例示することができる。

コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム ATCC13870
 コリネバクテリウム・アセトグルタミカム ATCC15806
 コリネバクテリウム・アルカノリティカム ATCC21511
 コリネバクテリウム・カルナエ ATCC15991
 コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC13020, 13032, 13060
 コリネバクテリウム・リリウム (コリネバクテリウム・グルタミカム) ATCC15990
 コリネバクテリウム・メラセコーラ ATCC17965
 コリネバクテリウム・サーモアミノゲネス AJ12340 (FERM BP-1539)
 コリネバクテリウム・ハーキュリス ATCC13868
 プレビバクテリウム・ディバリカタム (コリネバクテリウム・グルタミカム)
 ATCC14020

プレビバクテリウム・フラバム（コリネバクテリウム・グルタミカム） AT
CC 13826、ATCC 14067

プレビバクテリウム・インマリオフィラム ATCC 14068

プレビバクテリウム・ラクトフェルメンタム（コリネバクテリウム・グルタミカム） ATCC 13665、ATCC 13869、

プレビバクテリウム・ロゼウム ATCC 13825

プレビバクテリウム・サッカロリティカム ATCC 14066

プレビバクテリウム・チオゲニタリス ATCC 19240

プレビバクテリウム・アルバム ATCC 15111

プレビバクテリウム・セリヌム ATCC 15112

ミクロバクテリウム・アンモニアフィラム ATCC 15354

【0032】

A B C トランスポーター又はその構成成分をコードする遺伝子を改変する方法としては、これらの遺伝子の増幅又は破壊が挙げられる。遺伝子等の増幅は、遺伝子をプラスミド等のベクターに連結して得られる組換えベクターでコリネ型細菌を形質転換することによって行うことができる。その際、マルチコピー型のベクターを用いることによって、増幅の効率を高めることができる。そのようなベクターとしては、コリネ型細菌で自律複製出来るプラスミド、例えば以下のものが挙げられる。

【0033】

p AM 330 特開昭58-67699号公報参照

p HM 1519 特開昭58-77895号公報参照

p AJ 655 特開昭58-192900号公報参照

p AJ 611 同 上

p AJ 1844 同 上

p CG 1 特開昭57-134500号公報参照

p CG 2 特開昭58-35197号公報参照

p CG 4 特開昭57-183799号公報参照

p CG 11 同 上

【0034】

コリネ型細菌の形質転換は、電気パルス法（特開平2-207791号公報参照）により行うことができる。

【0035】

遺伝子の増幅は、本発明の遺伝子を上記宿主の染色体DNA上に多コピー存在させることによっても達成できる。コリネ型細菌の染色体DNA上に目的とする遺伝子を多コピーで導入するには、染色体DNA上に多コピー存在する配列を標的に利用して相同組換えにより行う (Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory press (1972); Matsuyama, S. and Mizushima, S., J. Bacteriol., 162, 1196(1985))。また、染色体DNA上に多コピー存在する配列としては、レペッティブDNA、転移因子の端部に存在するインバーティッド・リピートが利用できる。あるいは、特開平2-109985号公報に開示されているように、目的遺伝子をトランスポゾンに搭載してこれを転移させて染色体DNA上に多コピー導入することも可能である。

【0036】

また、染色体上にもともと存在する遺伝子のプロモーター等の発現調節配列を強力なもの又は機能の弱いものに置換することによっても、該遺伝子の発現を改変させることができる。

【0037】

一方、遺伝子の破壊は、相同組換による遺伝子破壊法が既に確立しており、直鎖DNAを用いる方法や温度感受性プラスミドを用いる方法などによって、行うことができる。

【0038】

【実施例】

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。

【0039】

(1) ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム ATCC13869のg1tBD遺伝子のクローニング

大腸菌と酵母のg1tB遺伝子産物間でアミノ酸配列の相同性の高い領域を選

び、その配列から塩基配列を推定し、配列番号1および配列番号2に示すオリゴヌクレオチドを合成した。一方、Bacterial Genomic DNA Purification Kit (Advanced Genetic Technologies Corp.製) を用いて、プレビバクテリウム・ラクトファーメンタム ATCC13869の染色体DNAを調製した。この染色体DNAを鋳型とし、前記オリゴヌクレオチドをプライマーに用いて、PCRテクノロジー（ヘンリーエーリッヒ編、ストックトンプレス、1989年）8頁に記載されている標準反応条件でPCRを行った。PCR産物をアガロースゲル電気泳動したところ、約1.4キロベースのDNA断片が増幅されていることが判明した。

【0040】

得られたDNAは、配列番号1および配列番号2に示すオリゴヌクレオチドを用いて両端の塩基配列の決定を行った。塩基配列の決定は、DNA Sequencing Kit (Applied Biosystems社製) を用いてSangerの方法 (J. Mol. Biol., 143, 161 (1980)) に従って行った。決定された塩基配列をアミノ酸配列に翻訳して、大腸菌と酵母の $gltB$ 遺伝子から予想されるアミノ酸配列と比較したところ、相同意性が高かったので、PCRにより増幅したDNA断片はプレビバクテリウム・ラクトファーメンタム ATCC13869の $gltB$ 遺伝子の一部であると判断した。このPCR増幅DNA断片をプローブとし、上記の方法で調製したプレビバクテリウム・ラクトファーメンタム ATCC13869の染色体DNAを定法によりEcoRI、BamHI、HindIII、PstI、SalI（宝酒造社製）で切断した断片について、DIG DNA Labeling and Detection Kit (ペーリングガー・マンハイム社製) を用いてサザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、HindIIIで切断された約14キロベースの切断断片がプローブDNAとハイブリダイズすることが判明した。

【0041】

そこで、定法により調製したプレビバクテリウム・ラクトファーメンタム ATCC13869染色体DNAのHindIII断片をアガロース電気泳動し、約10キロベース以上のDNA断片をガラスパウダーを用いて回収し、回収されたDNA断片と制限酵素HindIII（宝酒造社製）で切断したベクターpMW219（ニッポンジーン製）

はライゲーションキット（宝酒造社製）を用いて連結し、エシェリヒア・コリ J M109のコンピテントセル（宝酒造社製）を用いて形質転換を行った。形質転換株を IPTG（イソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド）10 μ g/m1、X-Gal（5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -D-ガラクトシド）40 μ g/m1及びカナマイシン25 μ g/m1を含むL培地（バクトトリプトン10 g/l、バクトトイーストエキストラクト5 g/l、NaCl 5 g/l、寒天15 g/l、pH 7.2）に塗布し、一晩培養後、出現した白色のコロニーを釣り上げ、単コロニー一分離し、約1,000個の形質転換体を得た。

【0042】 -

得られた形質転換体は、アルカリ法（生物工学実験書、日本生物工学会編、105頁、培風館、1992年）を用いてプラスミドを調製した。プローブとして用いたDNA配列の中で塩基配列が決定している部分をもとに作製した配列番号3および配列番号4に示す塩基配列を有する合成オリゴヌクレオチドをプライマーとして、上記プラスミドを鋳型として上記の条件でPCRを行い、このプライマーを用いてプレビバクテリウム・ラクトファーメンタム ATCC13869の染色体を鋳型としてPCRを行った時に増幅されるDNA断片と同じ約1.3キロベースの大きさの増幅断片が得られるプラスミドを保持する形質転換体を選択した。

【0043】

(2) プレビバクテリウム・ラクトフェルメンタム ATCC13869 g1 tBD遺伝子を含むDNA断片の全塩基配列の決定及びABCトランスポーター遺伝子の単離

上記(1)により得られた形質転換体からアルカリ法により調製したプラスミドDNAは、プレビバクテリウム・ラクトフェルメンタム ATCC13869染色体由来の約14キロベースのDNA断片を含んでいた。上記の方法と同様にして、得られたプラスミドのプレビバクテリウム・ラクトフェルメンタム ATCC13869染色体由来の約14キロベースのDNA断片の全塩基配列決定を行った。その結果、得られたDNA断片中には、g1tBD遺伝子の全長が含まれていたが、500 bp以上のオープン・リーディング・フレームがg1tBD遺伝子の

下流に末端から逆向きに2個存在し、これらのオープン・リーディング・フレームの下流にはターミネーターと推定される配列も存在することが明らかとなった。ただし、このオープン・リーディング・フレームは、プロモーター領域が欠けていたので、この上流部分を、下記のようにしてクローニングを行った。

【0044】

プレビバクテリウム・ラクトフェルメンタム ATCC13869染色体を制限酵素BamHIで消化したDNA断片から、配列表配列番号5および配列番号6に示したプライマーを使い、LA PCR *in vitro cloning Kit*（宝酒造製）を用いてクローニングを行った。上記プライマーを用いてPCRを行った結果、約1.8キロベースのDNA断片が増幅されたので、このDNA断片を上記と同様の方法での塩基配列の決定を行った。その結果、増幅されたDNA断片には、上記の2つのオープン・リーディング・フレームの上流に位置する、約350アミノ酸のオープン・リーディング・フレームが含まれており、さらにその上流にはプロモーター領域と推定される領域が存在することも明らかとなった。したがって、この3個のオープン・リーディング・フレームは、オペロンである可能性がある。

【0045】

これらのオープン・リーディング・フレームの塩基配列は、配列表配列番号7に示す通りである。配列表配列番号7の配列には、その塩基配列から推定される産物のアミノ酸配列も示した。このうち、塩基番号1～1101が1番目のオープン・リーディング・フレームで、1117～1725が2番目のオープン・リーディング・フレームで、さらに1759～2367が3番目のオープン・リーディング・フレームである。なお、それぞれのオープン・リーディング・フレームによりコードされるタンパク質のN末端にあるメチオニン残基は開始コドンであるATGに由来するため、タンパク質本来の機能とは無関係であることが多く、翻訳後ペプチダーゼの働きにより除去されることがよく知られており、上記の各タンパク質の場合にもメチオニン残基の除去が生じている可能性がある。また、ここで推定されたプロモーター領域やターミネーター配列は、あくまでもコンピューターを使った解析の結果であるので、実際にはこの上流もしくは下流にオープン・リーディング・フレームが存在し、それらも一緒に発現している可能性もある。

【0046】

塩基配列、アミノ酸配列おののについて既知の配列と相同性比較を行った。

用いたデータベースは、EMBLおよびSWISS-PROTである。その結果、配列表配列番号7に示されるDNAおよびそれにコードされる各タンパク質は、コリネバクテリウム属細菌では新規の遺伝子及びタンパク質であることが明らかとなった。このうち2番目のオープン・リーディング・フレームおよびそれにコードされるタンパク質は、すでに報告されているABCトランスポーターのATP結合タンパク質及びそれをコードする遺伝子と相同性が高く、コリネバクテリウム属細菌では新規なATP結合タンパク質をコードする遺伝子であることが判明した。

【0047】

【発明の効果】

本発明により、ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタムのABCトランスポーターの構成成分、及びそれらをコードするDNAが提供される。本発明の遺伝子は、コリネ型細菌の育種に利用することができる。

【0048】

【配列表】

Sequence Listing

【0049】

<110> 味の素株式会社(Ajinomoto Co., Inc.)

<120> ABCトランスポーター及びそれをコードする遺伝子

<130> P-6003

<141> 1998-12-18

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.0

【0050】

<210> 1

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> UNSURE

<222> (3,9,12)

<223> n=a or c or g or t

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for
amplifying *Brevibacterium lactofermentum* gltBD gene

<400> 1

ggngarggng gngarga

17

[0051]

<210> 2

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> UNSURE

<222> (1,4,7,)

<223> n=a or c or g or t

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for
amplifying *Brevibacterium lactofermentum* gltBD gene

<400> 2

nccnccngtc atrtaytc

18

[0052]

<210> 3

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for
amplifying *Brevibacterium lactofermentum* gltBD gene

<400> 3

aatccacgtg aagctagtgg cagaacaagg cg

32

[0053]

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for
amplifying *Brevibacterium lactofermentum* gltBD gene

<400> 4

acgaatgaac aattcaccac tggttgcgcc

30

[0054]

<210> 5

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for
amplifying downstream region of gltBD gene

<400> 5

atcctcgaca aggatctgtc cg

22

[0055]

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for
amplifying downstream region of gltBD gene

<400> 6

ggtttgtcaa gtgtgccaag acagttgagc

30

[0056]

<210> 7

<211> 2370

<212> DNA

<213> *Brevibacterium lactofermentum*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1101)

<220>

<221> CDS

<222> (1117)..(1725)

<220>

<221> CDS

<222> (1759)..(2367)

<400> 7

atg ctg gcg acc cga cta att acc ttg ttc ttt ttc cta gga atc att 48

Met Leu Ala Thr Arg Leu Ile Thr Leu Phe Phe Phe Leu Gly Ile Ile

1 5 10 15

gga tcg cta acc ggt aac ctc agt gaa cta cgt gca caa act act ttt 96

Gly Ser Leu Thr Gly Asn Leu Ser Glu Leu Arg Ala Gln Thr Thr Phe

20 25 30

agt aca tta tgg gat acc cat aaa gaa acc tat aga gtc tcc ata gct 144

Ser Thr Leu Trp Asp Thr His Lys Glu Thr Tyr Arg Val Ser Ile Ala

35 40 45

tcc gca gca gga caa gac ttc tac ggg ctt gct gag act cta cgc act	192
Ser Ala Ala Gly Gln Asp Phe Tyr Gly Leu Ala Glu Thr Leu Arg Thr	
50 55 60	
atg gat agg cat ggg gaa att att ttg gca gat cgt caa tgg tta aca	240
Met Asp Arg His Gly Glu Ile Ile Leu Ala Asp Arg Gln Trp Leu Thr	
65 70 75 80	
gct ccc ctt gat atc ggt gca cca gtc gta tta tca aac aca act ttt	288
Ala Pro Leu Asp Ile Gly Ala Pro Val Val Leu Ser Asn Thr Thr Phe	
85 90 95	
gcc gtt gat gaa gga cta ctt gcg cca aaa gat cta ccg caa agt gac	336
Ala Val Asp Glu Gly Leu Leu Ala Pro Lys Asp Leu Pro Gln Ser Asp	
100 105 110	
gag atc aca ata ttg cat cct cag ttt ctg gat tcg gcc aaa gag cca	384
Glu Ile Thr Ile Leu His Pro Gln Phe Leu Asp Ser Ala Lys Glu Pro	
115 120 125	
gaa tta ctt ggt ttg ctg gag ttc gaa gca tcc aac tca caa gtg cca	432
Glu Leu Leu Gly Leu Leu Glu Phe Glu Ala Ser Asn Ser Gln Val Pro	
130 135 140	
atg cca aag atc caa agc att cca tat gat agc gaa gac tca acc aac	480
Met Pro Lys Ile Gln Ser Ile Pro Tyr Asp Ser Glu Asp Ser Thr Asn	
145 150 155 160	
ccc atg tct gaa gtt ttt acc tac aac att aac ctg gat agt gca gta	528
Pro Met Ser Glu Val Phe Thr Tyr Asn Ile Asn Leu Asp Ser Ala Val	
165 170 175	
aga aac cca atc gta gtt atc ctt ccc gca ggc tta gag ctt tta agt	576
Arg Asn Pro Ile Val Val Ile Leu Pro Ala Gly Leu Glu Leu Ser	
180 185 190	
gat caa aat ttg tcg gct cga ctc aca cag aat agt ctg ctg ata aaa	624
Asp Gln Asn Leu Ser Ala Arg Leu Thr Gln Asn Ser Leu Leu Ile Lys	

195	200	205	
gac cag act ggt gtg aac gct ctt cta tcc tca gag gat tca cgc aat			672
Asp Gln Thr Gly Val Asn Ala Leu Leu Ser Ser Glu Asp Ser Arg Asn			
210	215	220	
tat gtg gga gct gca tcc ccg atg att gac acg tgg gaa gaa agc gtt			720
Tyr Val Gly Ala Ala Ser Pro Met Ile Asp Thr Trp Glu Glu Ser Val			
225	230	235	240
gtt cgg ttg aag gaa gcg aac caa ata atc gcc ttc aac gct ttc att			768
Val Arg Leu Lys Glu Ala Asn Gln Ile Ile Ala Phe Asn Ala Phe Ile			
245	250	255	
gca ttg ttc ctc acg acg act ctt gtt cta gca tac tgc act ggt att			816
Ala Leu Phe Leu Th r Thr Thr Leu Val Leu Ala Tyr Cys Thr Gly Ile			
260	265	270	
tca ttt aag aaa tca aag aag act atg ggt agc gca tct act agg aaa			864
Ser Phe Lys Lys Ser Lys Lys Thr Met Gly Ser Ala Ser Thr Arg Lys			
275	280	285	
tca tcc att aag agc tcg att aca gct gct aat tgt aga agt aat ttt			912
Ser Ser Ile Lys Ser Ser Ile Thr Ala Ala Asn Cys Arg Ser Asn Phe			
290	295	300	
cgc ttc aat tcc gtg cgt ctg gct cgc gaa ccg cta ttt cga gcg atc			960
Arg Phe Asn Ser Val Arg Leu Ala Arg Glu Pro Leu Phe Arg Ala Ile			
305	310	315	320
tgc agc aat agc ttc aga tgc tcc ctc agc cag ata ctt aga aca tct			1008
Cys Ser Asn Ser Phe Arg Cys Ser Leu Ser Gln Ile Leu Arg Thr Ser			
325	330	335	
caa ttc tat acc tcc atc act gcc gtt ggt ttt agg aat ctt aat aat			1056
Gln Phe Tyr Thr Ser Ile Thr Ala Val Gly Phe Arg Asn Leu Asn Asn			
340	345	350	
cgg ttg gac ttc act ttc att ttt cag ttc gat gaa gct tcc ttt			1101

Arg Leu Asp Phe Thr Phe Ile Phe Gln Phe Asp Glu Ala Ser Phe

355

360

365

tgaaaagac acaca atg ata gaa atc aat gac ctc aag aaa tct ttt ggc 1152

Met Ile Glu Ile Asn Asp Leu Lys Lys Ser Phe Gly

1

5

10

gtt cggt atc tta tgg caa ggt ctc agt cat aag ttt tta cca gga aca 1200

Val Arg Ile Leu Trp Gln Gly Leu Ser His Lys Phe Leu Pro Gly Thr

15

20

25

atg aca gca ctg act gga gcg tcc ggt tca gga aac tcg act ttg ctc 1248

Met Thr Ala Leu Thr Gly Ala Ser Gly Ser Gly Lys Ser Thr Leu Leu

30

35

40

aac tgt ctt ggc aca ctt gac aac cca agt tcc gga cag atc ctt gtc 1296

Asn Cys Leu Gly Thr Leu Asp Lys Pro Ser Ser Gly Gln Ile Leu Val

45

50

55

60

gag gat gta gac ctt ctg aac ctc tct acg cgt aac caa cgg tta tac 1344

Glu Asp Val Asp Leu Leu Lys Leu Ser Thr Arg Lys Gln Arg Leu Tyr

65

70

75

agg aac aat acg gtg ggc tat tta ttt caa gat tat gcc ttg att ccc 1392

Arg Lys Asn Thr Val Gly Tyr Leu Phe Gln Asp Tyr Ala Leu Ile Pro

80

85

90

gac agg aca gtt aac ttc aac ctt cag ctt gcg gtg gaa aac cac aac 1440

Asp Arg Thr Val Lys Phe Asn Leu Gln Leu Ala Val Glu Lys His Lys

95

100

105

tgg cct gaa att cct caa gta ctt cat gct gtt ggt ctt gag tcg ttc 1488

Trp Pro Glu Ile Pro Gln Val Leu His Ala Val Gly Leu Glu Ser Phe

110

115

120

gag gaa aac cca gtt ttt gaa ctc tct ggt ggc gaa caa caa cga act 1536

Glu Glu Lys Pro Val Phe Glu Leu Ser Gly Gly Glu Gln Gln Arg Thr

125

130

135

140

gct ttg gcc cgg gta ctg ctc aaa aat ccc cga ata att ctg gct gat			1584
Ala Leu Ala Arg Val Leu Leu Lys Asn Pro Arg Ile Ile Leu Ala Asp			
145	150	155	
gaa cca acc gga gct cta gat tta aca aac agt gag cta gtc ata gaa			1632
Glu Pro Thr Gly Ala Leu Asp Leu Thr Asn Ser Glu Leu Val Ile Glu			
160	165	170	
gca ttg aga gca ctc gcc gac aaa ggc gcc acc gtt gtt gtt gct acg			1680
Ala Leu Arg Ala Leu Ala Asp Lys Gly Ala Thr Val Val Val Ala Thr			
175	180	185	
cac tcg ccc ctc ttc cga gaa tca gcg gat acc att atc aaa cta			1725
His Ser Pro Leu Phe Arg Glu Ser Ala Asp Thr Ile Ile Lys Leu			
190	195	200	
taggtggccc aacttttcgg agatctcagt gca atg atg gaa ttc tta aac act			1779
Met Met Glu Phe Leu Asn Thr			
1	5		
cac cgt ttg att gtt ctc ggg agt ttg tct ttt cta ggg cta ggt ttc			1827
His Arg Leu Ile Val Leu Gly Ser Leu Ser Phe Leu Gly Leu Gly Phe			
10	15	20	
gct gaa gtc ctg ctg cgt ggc cag tgg tca aca ccg cag ttt ttt gtt			1875
Ala Glu Val Leu Leu Arg Gly Gln Trp Ser Thr Pro Gln Phe Phe Val			
25	30	35	
ttc act ttc ttg caa act ctg ctt ctc gta ttg tgt ttt att cct aaa			1923
Phe Thr Phe Leu Gln Thr Leu Leu Val Leu Cys Phe Ile Pro Lys			
40	45	50	55
ctc tcg gtt cct ttt gtg gtg ctt cta agc att gcc caa ctc gcg ctt			1971
Leu Ser Val Pro Phe Val Val Leu Leu Ser Ile Ala Gln Leu Ala Leu			
60	65	70	
gca tac ctg tgt att cat ggt gaa cct caa agc acc agc cct ttc act			2019
Ala Tyr Leu Cys Ile His Gly Glu Pro Gln Ser Thr Ser Pro Phe Thr			

75	80	85	
tta att gtt gcc caa atg gcg ttt tcg gga ttg ctc atg ttc aga ggg			2067
Leu Ile Val Ala Gln Met Ala Phe Ser Gly Leu Leu Met Phe Arg Gly			
90	95	100	
caa cgg gtg ctc gct ttt atc tct gca ggt ggg ctc att tgg att ggg			2115
Gln Arg Val Leu Ala Phe Ile Ser Ala Gly Gly Leu Ile Trp Ile Gly			
105	110	115	
acc atc gat cca aca aac ggt gct tgg tct cct cat gtg atg tcc gcg			2163
Thr Ile Asp Pro Thr Asn Gly Ala Trp Ser Pro His Val Met Ser Ala			
120	125	130	135
cta gca ctt gcc gta ttc ttt gcg ctg tcg atg gca ctt gga cag gtt			2211
Leu Ala Leu Ala Val Phe Phe Ala Leu Ser Met Ala Leu Gly Gln Val			
140	145	150	
ctt cga tca aaa gtt gaa caa aga gcc aac ctt gag gag cag gca aaa			2259
Leu Arg Ser Lys Val Glu Gln Arg Ala Asn Leu Glu Glu Gln Ala Lys			
155	160	165	
att cag aca gaa ctg cgc aga aaa gaa cta agc act cca tct gca tcg			2307
Ile Gln Thr Glu Leu Arg Arg Lys Glu Leu Ser Thr Pro Ser Ala Ser			
170	175	180	
gtc ggt tgc caa aga act tac gtt tgc agt gat gaa atc gca gga gct			2355
Val Gly Cys Gln Arg Thr Tyr Val Cys Ser Asp Glu Ile Ala Gly Ala			
185	190	195	
cag tgg tcg cga taa			2370
Gln Trp Ser Arg			
200			
[0057]			
<210> 8			
<211> 367			
<212> PRT			

<213> **Brevibacterium lactofermentum**

<400> 8

Met Leu Ala Thr Arg Leu Ile Thr Leu Phe Phe Phe Leu Gly Ile Ile

1 5 10 15

Gly Ser Leu Thr Gly Asn Leu Ser Glu Leu Arg Ala Gln Thr Thr Phe

20 25 30

Ser Thr Leu Trp Asp Thr His Lys Glu Thr Tyr Arg Val Ser Ile Ala

35 40 45

Ser Ala Ala Gly Gln Asp Phe Tyr Gly Leu Ala Glu Thr Leu Arg Thr

50 55 60

Met Asp Arg His Gly Glu Ile Ile Leu Ala Asp Arg Gln Trp Leu Thr

65 70 75 80

Ala Pro Leu Asp Ile Gly Ala Pro Val Val Leu Ser Asn Thr Thr Phe

85 90 95

Ala Val Asp Glu Gly Leu Leu Ala Pro Lys Asp Leu Pro Gln Ser Asp

100 105 110

Glu Ile Thr Ile Leu His Pro Gln Phe Leu Asp Ser Ala Lys Glu Pro

115 120 125

Glu Leu Leu Gly Leu Leu Glu Phe Glu Ala Ser Asn Ser Gln Val Pro

130 135 140

Met Pro Lys Ile Gln Ser Ile Pro Tyr Asp Ser Glu Asp Ser Thr Asn

145 150 155 160

Pro Met Ser Glu Val Phe Thr Tyr Asn Ile Asn Leu Asp Ser Ala Val

165 170 175

Arg Asn Pro Ile Val Val Ile Leu Pro Ala Gly Leu Glu Leu Leu Ser

180 185 190

Asp Gln Asn Leu Ser Ala Arg Leu Thr Gln Asn Ser Leu Leu Ile Lys

195 200 205

Asp Gln Thr Gly Val Asn Ala Leu Leu Ser Ser Glu Asp Ser Arg Asn

210

215

220

Tyr Val Gly Ala Ala Ser Pro Met Ile Asp Thr Trp Glu Glu Ser Val

225

230

235

240

Val Arg Leu Lys Glu Ala Asn Gln Ile Ile Ala Phe Asn Ala Phe Ile

245

250

255

Ala Leu Phe Leu Thr Thr Leu Val Leu Ala Tyr Cys Thr Gly Ile

260

265

270

Ser Phe Lys Lys Ser Lys Lys Thr Met Gly Ser Ala Ser Thr Arg Lys

275

280

285

Ser Ser Ile Lys Ser Ser Ile Thr Ala Ala Asn Cys Arg Ser Asn Phe

290

295

300

Arg Phe Asn Ser Val Arg Leu Ala Arg Glu Pro Leu Phe Arg Ala Ile

305

310

315

320

Cys Ser Asn Ser Phe Arg Cys Ser Leu Ser Gln Ile Leu Arg Thr Ser

325

330

335

Gln Phe Tyr Thr Ser Ile Thr Ala Val Gly Phe Arg Asn Leu Asn Asn

340

345

350

Arg Leu Asp Phe Thr Phe Ile Phe Gln Phe Asp Glu Ala Ser Phe

355

360

365

[0058]

<210> 9

<211> 203

<212> PRT

<213> *Brevibacterium lactofermentum*

<400> 9

Met Ile Glu Ile Asn Asp Leu Lys Lys Ser Phe Gly Val Arg Ile Leu

1

5

10

15

Trp Gln Gly Leu Ser His Lys Phe Leu Pro Gly Thr Met Thr Ala Leu

20

25

30

Thr Gly Ala Ser Gly Ser Gly Lys Ser Thr Leu Leu Asn Cys Leu Gly

35

40

45

- Thr Leu Asp Lys Pro Ser Ser Gly Gln Ile Leu Val Glu Asp Val Asp

50

55

60

Leu Leu Lys Leu Ser Thr Arg Lys Gln Arg Leu Tyr Arg Lys Asn Thr

65

70

75

80

Val Gly Tyr Leu Phe Gln Asp Tyr Ala Leu Ile Pro Asp Arg Thr Val

85

90

95

Lys Phe Asn Leu Gln Leu Ala Val Glu Lys His Lys Trp Pro Glu Ile

100

105

110

Pro Gln Val Leu His Ala Val Gly Leu Glu Ser Phe Glu Glu Lys Pro

115

120

125

Val Phe Glu Leu Ser Gly Gly Glu Gln Gln Arg Thr Ala Leu Ala Arg

130

135

140

Val Leu Leu Lys Asn Pro Arg Ile Ile Leu Ala Asp Glu Pro Thr Gly

145

150

155

160

Ala Leu Asp Leu Thr Asn Ser Glu Leu Val Ile Glu Ala Leu Arg Ala

165

170

175

Leu Ala Asp Lys Gly Ala Thr Val Val Val Ala Thr His Ser Pro Leu

180

185

190

Phe Arg Glu Ser Ala Asp Thr Ile Ile Lys Leu

195

200

[0059]

<210> 10

<211> 203

<212> PRT

<213> Brevibacterium lactofermentum

<400> 10

Met Met Glu Phe Leu Asn Thr His Arg Leu Ile Val Leu Gly Ser Leu

1

5

10

15

Ser Phe Leu Gly Leu Gly Phe Ala Glu Val Leu Leu Arg Gly Gln Trp
 20 25 30
 Ser Thr Pro Gln Phe Phe Val Phe Thr Phe Leu Gln Thr Leu Leu
 35 40 45
 Val Leu Cys Phe Ile Pro Lys Leu Ser Val Pro Phe Val Val Leu Leu
 50 55 60
 Ser Ile Ala Gln Leu Ala Leu Ala Tyr Leu Cys Ile His Gly Glu Pro
 65 70 75 80
 Gln Ser Thr Ser Pro Phe Thr Leu Ile Val Ala Gln Met Ala Phe Ser
 85 90 95
 Gly Leu Leu Met Phe Arg Gly Gln Arg Val Leu Ala Phe Ile Ser Ala
 100 105 110
 Gly Gly Leu Ile Trp Ile Gly Thr Ile Asp Pro Thr Asn Gly Ala Trp
 115 120 125
 Ser Pro His Val Met Ser Ala Leu Ala Leu Ala Val Phe Phe Ala Leu
 130 135 140
 Ser Met Ala Leu Gly Gln Val Leu Arg Ser Lys Val Glu Gln Arg Ala
 145 150 155 160
 Asn Leu Glu Glu Gln Ala Lys Ile Gln Thr Glu Leu Arg Arg Lys Glu
 165 170 175
 Leu Ser Thr Pro Ser Ala Ser Val Gly Cys Gln Arg Thr Tyr Val Cys
 180 185 190
 Ser Asp Glu Ile Ala Gly Ala Gln Trp Ser Arg
 195 200

【書類名】 要約書

【要約】

【解決手段】 下記（A）又は（B）に示すタンパク質及びそれをコードするDNA。

(A) 配列表の配列番号8、9又は10に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列表の配列番号8、9又は10に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、ABCトランスポーターを構成するタンパク質。

【効果】 ブレビパクテリウム・ラクトファーメンタムのABCトランスポーターの構成成分及びそれらをコードするDNAが提供される。本発明のDNAは、コリネ型細菌の育種に利用することができる。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 000000066
【住所又は居所】 東京都中央区京橋1丁目15番1号
【氏名又は名称】 味の素株式会社
【代理人】 申請人
【識別番号】 100089244
【住所又は居所】 東京都中央区東日本橋3丁目4番10号 ヨコヤマ
ビル6階 秀和特許法律事務所
【氏名又は名称】 遠山 勉

【選任した代理人】

【識別番号】 100090516
【住所又は居所】 東京都中央区東日本橋3丁目4番10号 ヨコヤマ
ビル6階 秀和特許法律事務所
【氏名又は名称】 松倉 秀実

【選任した代理人】

【識別番号】 100100549
【住所又は居所】 東京都中央区東日本橋3丁目4番10号 ヨコヤマ
ビル6階 秀和特許法律事務所
【氏名又は名称】 川口 嘉之

出願人履歴情報

識別番号 [000000066]

1. 変更年月日 1991年 7月 2日

[変更理由] 住所変更

住 所 東京都中央区京橋1丁目15番1号

氏 名 味の素株式会社